

动 物 学 研 究 1998，19 (5)：367～373 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

细胞内外钙离子浓度对鲎腹神经感光器光适应的影响*

袁维佳 H.Stieve
（上海师范大学生物系 上海 200234） （德国亚琛工业大学动物学研究所）

摘 要 用细胞内记录的方法研究了由微弱持续光刺激（6×10^6～9×10^6 光子/cm²，10 s）引起鲎（*Limulus polyphemus*）腹神经感光器膜电流的变化——光碰击。结果表明，在生理盐水（10 mmol/L Ca^{2+}）中光碰击的平均面积为（39.5±1.76）pC，微弱光适应（记录前 2.5 s 加 1 次光闪，9×10^9 光子/cm²）使得光碰击的面积下降至（10.5±2.29）pC（$n=4$）。在低钙溶液（0.25 mmol/L Ca^{2+}）中，光适应的作用没有减弱，这次光闪使得平均的光碰击面积从（92±18.7）pC 下降到（29±3.04）pC。为了消耗细胞内储存的钙离子，在低钙溶液中对感光器进行几次强光刺激（6.4×10^{14}光子/cm²），这时由 2.5 s 前光闪引起的光适应现象减弱，光碰击的平均面积从（81±12.9）pC 降到（41±3.74）pC。把 1.2 mmol/L EGTA 注入到浸浴在生理盐水中的感光器后，2.5 s 前光闪造成的光适应现象消失。实验结果说明，光刺激使得钙离子从存储器中释放出来，造成细胞内钙离子浓度上升、决定了感光器的光适应程度。

关键词 鲎，感光器，钙离子浓度，钙离子螯合剂，光碰击
中图分类号 Q959.223.13

钙离子在无脊椎动物感光过程中起着重要的作用。研究发现光刺激后感光器细胞内钙离子浓度明显上升。钙离子对调节感光器的适应性、对膜传导性的改变和膜电位的改变引起的兴奋电流以及对膜电位的上升都产生影响（Lisman 等，1982；Bolsover 等，1985；Deckert 等，1991）。

光碰击是感光细胞对光刺激的基本反应，它是由单个光子击中一个视紫红质分子后造成的细胞膜电流短暂变化而形成的膜电流信号。通过对光碰击的研究可探讨感光器对光刺激反应的机理。我们通过改变鲎（*Limulus polyphemus*）腹神经感光器内外钙离子浓度来研究光碰击的变化，从而探讨细胞内钙离子浓度变化与光碰击的关系。通过向感光细胞注入钙离子螯合剂和在低钙溶液中用强光刺激以耗尽细胞器中储存的钙离子等方法，研究感光细胞的光适应与钙离子浓度变化的关系，为深入研究动物的感光过程提供电生理学方面的数据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验所用的鲎为美国大西洋沿岸的野生种类，以 Stieve（1985）的方法解剖分离出腹神经，在 4℃黑暗中放在培养液（Kass 等，1988）里 18～36 h。实验前，腹神经先用骨胶

---

* 国家自然科学基金资助项目
本文 1997-05-05 收到，1998-05-25 修回

酶 2 mg/mL 处理 10 min，然后固定在实验槽中。

1.2 实验溶液

实验所用溶液，一种是生理盐水，另一种是低钙溶液（表 1）。溶液以 1 mL/min 的流量流过实验槽，溶液的温度控制在 (15±0.1)℃。更换溶液时，槽中 90%溶液在 5 min 内更换完。更换溶液后约 30 min，测量光引起的碰击。

表 1 实验所用的生理盐水和低钙溶液的配方

Table 1 Composition of physiological saline and low concentration calcium solution

	NaCl	KCl	$MgCl_2$	$MgSO_4$	$CaCl_2$	NaOH	HEPES
生理盐水（10 mmol/L Ca^{2+}）	485.8	10.0	25.0	30.0	10.0	5.0	10.0
低钙溶液（0.25 mmol/L Ca^{2+}）	485.8	10.0	34.6	30.0	0.25	5.0	10.0

1.3 实验仪器及方法

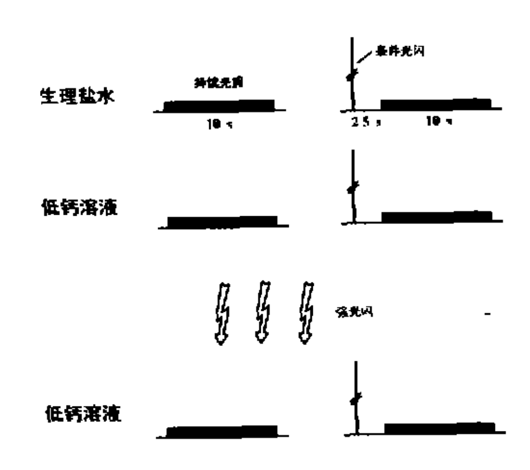


图 1 光碰击记录过程示意图

Fig.1 Scheme of the measuring cycle of light induced bump

实验所用仪器与 Stieve 等（1994）所叙述相同。用 1 根注满 0.5 mol/L KCl 溶液的玻璃微管刺入感光器，微管尖的电阻为 4～9 MΩ，从微管中引出银－氯化银电极。在静息电位处钳制细胞膜电位。光引起的膜电流用单电极电压钳仪（SC-100，VF-180CA 和 CA-100 Instruments de Laboratories Biologic, France）记录。通过515nm过滤器的卤素灯作为光源，经过光导纤维刺激暗适应的感光器，每次持续 10 s。强度为 6×10^6～9×10^6 光子/cm^2。为了使感光器处于微弱的光适应状态，在测量光碰击前 2.5 s 使用了 1 次条件光闪（9×10^9 光子/cm^2）。暗适应和光适应的感光器对持续 10 s 的弱光刺激产生约 5 个光碰击。在低钙溶液中强光闪（6.4×10^{14}光子/cm^2）刺激细胞若干次，间隔 5 min，以便耗尽细胞内储存的钙离子。整个实验光刺激过程见图 1。在每种实验溶液中记录 64～100 次 10 s 微弱光刺激产生的所有碰击，但只分析单个碰击的参数。

为了进一步研究细胞内钙离子对光碰击的影响，使用了一种钙离子螯合剂 EGTA（乙二醇，双乙胺醚 N-N'四乙酸）。用压缩空气向浸浴在生理溶液里的感光器内注入 1.2 mmol/L EGTA，约 30～60 pL。然后重复图 1 中的光刺激过程。实验的控制、光碰击信号的记录和分析都由 IBM 微机完成，结果用 t 检验，以平均值±标准误（$\overline{X}\pm SE$）表示。

1.4 光碰击信号分析

为了比较光碰击的大小，分析了下列光碰击参数。碰击电流的时间积分（碰击的面积）：10^{-12}库仑（pC）；碰击振幅的峰值：10^{-9}安培（nA）；碰击的持续时间：10^{-3}秒（ms）；碰击的半宽度（即等于碰击上升相的半时间与碰击下降相的半时间之和）：10^{-3}秒（ms）；碰击指数衰退的时间常数：$1/10^{-3}$秒（1/ms）。

2 结 果

2.1 在生理溶液中的光碰击

在暗适应时记录了 4 次实验，微弱光（6×10^6 光子/cm^2）刺激造成的光碰击频率是（0.58±0.038）个/s（碰击个数 $N=1\,484$），其中单个的碰击为（0.55±0.034）个/s。光碰击的振幅变化较大（图 2），平均振幅达到（0.24±0.075）nA（$N=1\,408$）。平均的光碰击面积为（39.5±1.76）pC，1 次实验的全部单个光碰击面积频率分布如图 3a 所示。

2.5 s 前的 1 次光闪使得感光器处于微弱的光适应状态。这时，光碰击的出现为（0.61±0.085）个/s（$N=1\,564$），而单个的光碰击频率为（0.58±0.082）个/s。光碰击面积的频率分布与暗适应时相比较，在宽度上有较大的缩小（图 3a），光碰击的平均振幅下降了 50%，为（0.12±0.036）nA，平均面积下降了 73%，只有（10.5±2.29）pC，这些差异是显著的（$P<0.05$）。

另外，在暗适应和光适应不同状态时，细胞产生的光碰击在碰击的半宽度、碰击指数衰退的时间常数等参数上均有显著差异（表 2）。

表 2 在不同钙离子浓度中暗适应和光适应两种状态时光碰击参数的比较（细胞=4）

Table 2 Comparison of averaged parameters of single lightbumps with physiological saline and low Ca-solution measured in dark and light adaptations (cell = 4)

	生理溶液		低钙溶液	
	暗适应	微弱光适应	暗适应	微弱光适应
碰击/个·s^{-1}	0.55±0.034	0.58±0.082	0.41±0.052	0.51±0.057
振幅/nA	0.24±0.075	0.12±0.036*	0.85±0.220	0.34±0.071*
面积/pC	39.5±1.76	10.5±2.29*	92.0±18.74	29.4±3.04*
半宽度/ms	74±10.6	64±8.7	79±10.4	61±4.6
时间常数/ms^{-1}	0.021±0.0027	0.035±0.0059*	0.031±0.0056	0.058±0.0088*

	低钙溶液（强光刺激后）	
	暗适应	微弱光适应
碰击/个·s^{-1}	0.59±0.107	0.79±0.047
振幅/nA	0.72±0.175	0.47±0.058
面积/pC	81.4±12.92	41.5±3.74*
半宽度/ms	80±10.2	65±2.9
时间常数/ms^{-1}	0.028±0.0122	0.038±0.0043

* 两组数据有显著差异（$P<0.05$）[an asterisk marks statistically different data between the two states of adaptation ($P<0.05$)]。

2.2 在低钙溶液中的光碰击

当实验溶液中的钙离子浓度从 10 mmol/L 下降到 0.25 mmol/L 时，4 个暗适应的感光器在每次持续 10 s 的微弱光刺激下，平均每个细胞产生（0.62±0.064）个光碰击/s（$N=1\,536$），其中单个的碰击为（0.41±0.052）个/s（$N=1\,024$）。光碰击的信号增大（图 2）。在微弱光适应时，单个光碰击的频率为（0.51±0.057）个/s（$N=1\,528$）。小型光碰

击信号出现的频率增多（图 3b, c)，光碰击的一些参数与暗适应时的光碰击相比有显著差异（表 2)。

用强光闪 3 次刺激感光器后，再次处于暗适应的感光器平均产生（0.61±0.097）个光碰击/s（N=1 564)，单个的光碰击频率为（0.59±0.107）个/s（N=1 516)。光碰击的平均振幅和平均面积比强光闪刺激前略有下降，分别为（0.72±0.175）nA 和（81±12.9）pC。2.5 s 前的 1 次光闪所造成的微弱光适应，使得小光碰击的频率略有减少（图 3d)，感光器产生的光碰击除了在面积上降低了 49.4%，达到了（41±3.73）pC，与暗适应相比有明显的差异外，其他的参数与暗适应时的光碰击相比较无显著差异（表 2)。

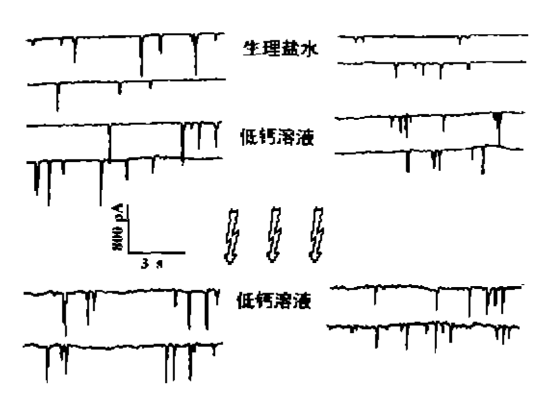


图 2 持续微弱光刺激引发的碰击信号

Fig.2 Bumps evoked by continuous weak illumination

膜电压钳制在 −46mV (the membrane potential was clamped to −46 mV)。

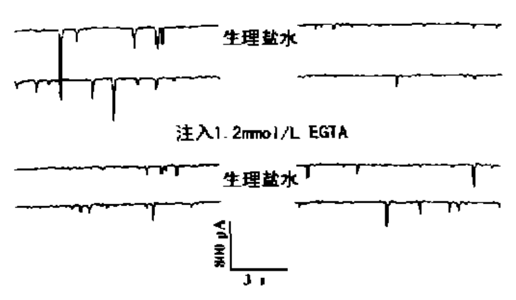


图 4 在生理盐水中 1.2 mmol/L EGTA 注入前后的光碰信号

Fig.4 Bumps evoked by continuous weak illumi nation with and without injected 1.2 mmol/L EGTA solution in physiological saline

膜电压钳制在 −45 mV (the membrane potential was clamped to-45 mV)。

2.3 在生理溶液中向感光器注入 EGTA 前后的光碰击

图 4 展示的是在生理溶液中向感光细胞注入 EGTA 前后，暗适应和微弱光适应的感光器在持续 10 s 微弱光（9×10^6 光子/cm^2）刺激下产生的光碰击信号。

8 次实验结果显示出，单个光碰击的产生频率平均为（0.9±0.05）个/s，不同光适应时光碰击的振幅、碰击的面积和碰击指数衰退的时间常数都有显著差异（$P<0.05$，表 3)，光适应时光碰击的面积频率分布比在暗适应时狭窄。

向感光器内注入 1.2 mmol/L EGTA 溶液后，暗适应的感光器对光的敏感性下降，8 次实验中单个碰击的平均数为（0.6±0.05）个/s（N=1 920)。碰击的平均振幅约是注入前的 52%，而光碰击的面积只达到了注入前的 46%。1.2 mmol/L EGTA 注入感光细胞后，也减弱了 2.5 s 前光闪对感光器造成的光适应影响，1 次实验的碰击面积的频率分布在光适应时反而比在暗适应时宽。8 次实验的平均结果显示出，光碰击的振幅、面积等参数与暗适应时感光细胞产生的碰击无显著差异。表 3 列出了 1.2 mmol/L EGTA 注入细胞后，对其光敏感性和产生的光碰击各种参数的影响。

3 讨 论

暗适应时细胞内的钙离子浓度约是 0.6 μmol/L（O'Day 等，1989)，细胞外的钙离子

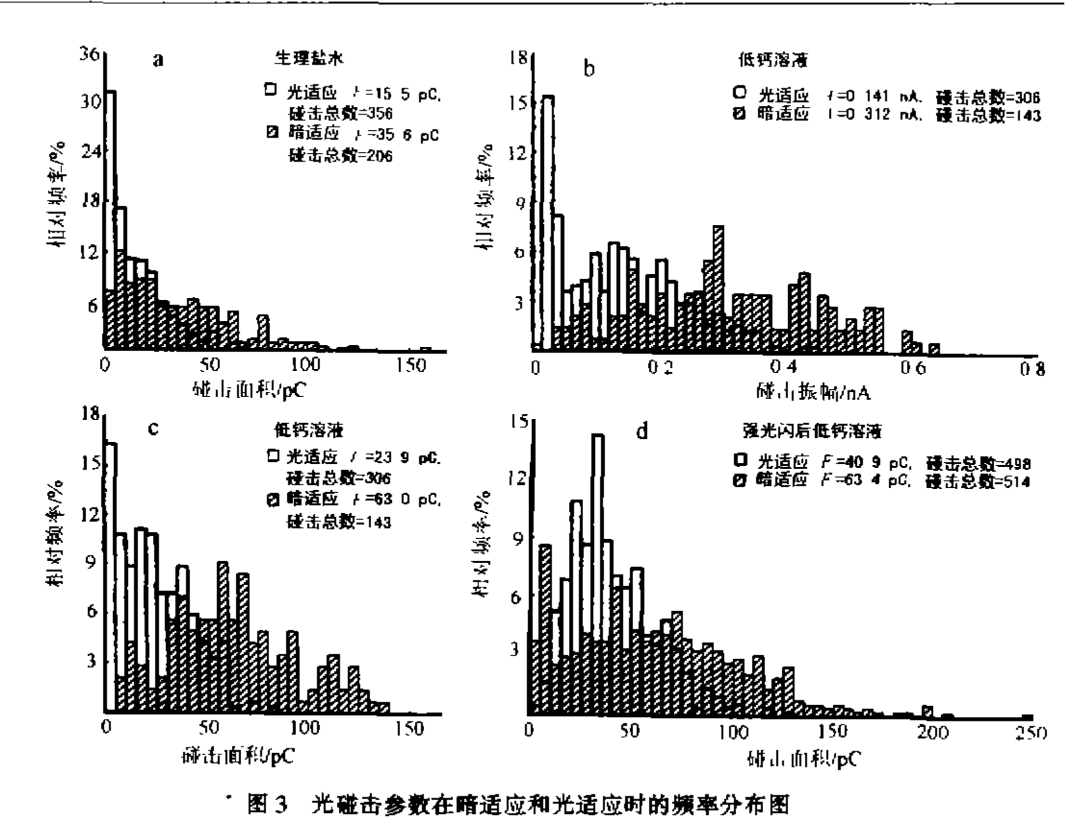


图 3　光碰击参数在暗适应和光适应时的频率分布图

Fig.3　Frequency distributions of bump parameters in dark and in light adaptation

表 3　在生理盐水中 EGTA 溶液注入前后不同适应状态时光碰击参数的比较（细胞＝8）

Table 3　Averaged parameters of single lightbumps before and after injection of EGTA-solution measured in physiological saline in two states of adaptation (cell＝8)

	1.2 mmol/L EGTA 注入前		1.2 mmol/L EGTA 注入后	
	暗适应	微弱光适应	暗适应	微弱光适应
碰击/个·s^{-1}	0.9±0.05	0.9±0.05	0.6±0.05	0.6±0.10
振幅/nA	0.28±0.051	0.16±0.019*	0.15±0.016	0.13±0.016
面积/pC	37± 8.2	18± 3.0*	17± 2.0	15±1.9
半宽度/ms	51±3.8	47±1.6	45±3.4	47±1.2
时间常数/ms^{-1}	0.06±0.006	0.08±0.007*	0.08±0.006	0.08± 0.002

* 两组数据有显著差异（$P<0.05$）[an asterisk marks statiscally different data between the two states of adaptation ($P<0.05$)]。

浓度可通过细胞膜上的 Na/Ca 交换，从而影响细胞内的钙离子浓度。用钙离子敏感的微电极测量发现，降低细胞外的钙离子浓度可使细胞内的钙离子浓度下降（Levy 等，1985)。感光器在低钙溶液中提高了对微弱光刺激的兴奋性，我们的研究结果显示出，暗适应的鲎腹神经感光器在微弱持续光刺激下产生的碰击，在低钙溶液中其振幅、面积、指数衰退的时间常数等参数大于在生理盐水中的碰击参数，感光器犹如处于更深的暗适应状态中。用微弱光闪得到的碰击也显示出，碰击延缓期、碰击持续时间和碰击振幅等参数在低钙溶液中更大（Stieve 等，1991)。但是，当用钙离子的螯合剂 EGTA 来降低细胞内游

离钙离子浓度时，感光器对微弱光刺激所产生的碰击不仅在数量上，而且在碰击的面积上都下降很多。感光器内的游离钙离子浓度极度降低时，感光器对光刺激的敏感性受到很大的抑制。

在碰击被记录前2.5 s，1次微弱光闪使得感光器处于微弱的光适应状态，碰击的振幅、面积等几个表示碰击大小的参数比在暗适应时明显下降。许多工作已证实，细胞内的钙离子浓度调节了感光器的光适应状态。当细胞内的钙离子浓度升高时，感光器对光刺激的反应变小（Fein等，1975；Payne等，1986a，1986b；Stieve等，1991）。而细胞外的钙离子浓度对感光器的光适应无直接影响，在生理盐水中和在低钙溶液中，条件光闪刺激对感光器造成的光适应是相同的。这个结果揭示了，光适应时引起细胞内钙离子升高的钙离子不是来自细胞外，而是来自于细胞内某类钙离子存储器。

感光器内的膜下潴泡囊是细胞内的钙离子存储器，其膜上的钙离子通道可被肌醇三磷酸（IP_3）开启（Payne等，1986b；Levy等，1993）。光刺激激活了细胞内酶促反应链，使得磷酸肌醇二磷酸（PIP_2）转变为肌醇三磷酸，最后导致膜下潴泡囊中的钙离子释放到胞质中，而使感光器处于光适应状态（Nagy等，1993；Stieve等，1994）。在低钙溶液里，由于细胞内外钙离子的浓度差异，释放到细胞质中的钙离子不是全部回到钙离子存储器中，而是有一部分通过细胞膜上的蛋白质离子交换到了细胞外。这样，经过几次的强光闪刺激，钙离子存储器中的钙离子就会被消耗很多。这时，1次条件光刺激就不会造成细胞内钙离子浓度大的波动。EGTA是强的钙离子螯合剂，它可和细胞质中的游离钙离子结合。当它被注入感光器内后，便阻止了条件光刺激引起的胞质中钙离子浓度的上升。我们的实验结果显示出，在低钙溶液中用强光闪刺激耗尽细胞内储存的钙离子或向细胞内注入EGTA，都使得条件光闪刺激对感光器造成的光适应有不同程度的下降，细胞在暗适应和光适应中产生的碰击无显著差异。

我们的实验结果证明：感光器外的钙离子浓度可影响其暗适应的程度，而对光适应没有明显的影响；造成感光器光适应的原因是细胞内钙离子浓度的上升，而这些钙离子来自于细胞内的某些钙离子存储器。

致谢 本研究得到了亚琛工业大学动物学研究所 Dorlöchter U. 博士、Stommel G. 博士和 Hennig T. H. 先生等多方面的帮助，在此表示感谢。

参 考 文 献

Bolsover S R, Brown J E, 1985. Calcium ion, an intracellular messenger of light adaptation, also participates in excitation of *Limulus* photoreceptors. *J. Physiol.*, **364**: 384 - 393.

Deckert A, Stieve H, 1991. Electrogenic Na/Ca exchange, The calcium components in the light-induced current of the *Limulus* ventral nerve photoreceptor. *J. Physiol.*, **433**: 467 - 482.

Fein A, Lisman J E, 1975. Localized desensitization of *Limulus* photoreceptors produced by light or intracellular calcium ion injection. *Science*, **187**: 1094 - 1096.

Kass L, Renninger G H, 1988. Circadian chang in function of *Limulus* ventral photoreceptors. *Visual Neuroscience*, **1**: 3 - 11.

Levy S, Fein A, 1985. Relationship between light sensitivity and intracellular free calcium concentration in *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, **85**: 805 - 841.

Levy S, Payne R, 1993. A lingering elevation of Ca, accompanies inhibition of inositol 1, 4, 5 trisphosphate-induced Ca release in *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, **101**: 67 - 84.

Lisman J E, Fein G, O'Day P M, 1982. Voltage dependent conductances in *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, **79**: 187－209.

Nagy K, Contzen K, Stieve H, 1993. Two components of the receptor current are developed from distinct elementary signals in *Limulus* ventral nerve photoreceptor. *Eur. Biophys. J.*, **18**: 221－224.

O'Day P M, Gray-Keller M P, 1989. Evidence for electrogenic Na^+/Ca^{2+} exchange in *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, **93**: 473－492.

Payne R, Corson D W, Fein A *et al*, 1986a. Pressure injection of calcium both excites and adapts *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, **88**: 107－126.

Payne R, Corson D W, Fein A *et al*, 1986b. Excitation and adaptation of *Limulus* ventral nerve photoreceptors by inositol 1, 4, 5, trisphosphate result from a rise in intracellular calcium. *J. Gen. Physiol.*, **88**: 127－142.

Stieve H, Pflaum M, Klomfass J *et al*, 1985. Calcium/sodium binding competition in the gating of light-activated membrane conductance studied by voltage clamp technique in *Limulus* ventral nerve photoreceptor. *Z. Naturforsch.*, **40c**: 278－291.

Stieve H, Reuss H, Hennig H T *et al*, 1991. Single photon evoked events of the ventral nerve photoreceptor cell of *Limulus*. Facilitation, adaptation and dependence on lowered external calcium. *Z. Naturforsch.*, **46c**: 461－486.

Stieve H, Rusing G, Yuan W *et al*, 1994. The effects of externally applied litzium and strontium on the arsenazo-monitored cytosolic calcium signal of the *Limulus* ventral nerve photoreceptor. *Z. Naturforsch.*, **49c**: 372－392.

THE INFLUENCE OF EXTRA- AND INTRACELLULAR CALCIUM ON THEADAPTATION OF *Limulus polyphemus* VENTRAL NERVE PHOTORECEPTORS

YUAN Wei-jia①　　H. Stieve②

(①*Department of Biology, Shanghai Normal University, Shanghai*　200234)

(②*Institute of Biology II, RWTH Aachen, Germany*)

Abstract

In physiological (10 mmol/L Ca^{2+}) or low calcium saline (0.25 mmol/L Ca^{2+}) bumps were evoked by dim continuous light ($6\times10^6\sim9\times10^6$ photons/cm^2; 10 s) in *Limulus polyphemus* ventral nerve photoreceptors. The photoreceptor was dark-adapted or weakly light-adapted by a 0.5 ms conditioning flash (9×10^9 photons/cm^2), 2.5 s prior to the continuous illumination. In 10 mmol/L external calcium the mean size (current-time integral) of the bumps was (39.5 ± 1.76) pC; the light adaptation caused a decrease to (10.5 ± 2.29) pC ($n=4$). In low calcium saline the effect of light adaptation was not reduced. The conditioning flash caused a reduction of the average bump size from (92 ± 18.7) pC to (29 ± 3.04) pC.

However, when in low calcium saline the photoreceptors were stimulated by a few strong flashes (6.4×10^{14} photons/cm^2) in order to exhaust the intracellular calcium stores, the effect of light adaptation by the conditioning flash was reduced. The light adaptation caused a reduction of the bump size from (81 ± 10.1) pC to (41 ± 3.74) pC. Injection of 1.2 mmol/L EGTA into the dark-adapted photoreceptors which were soaked by physiological saline almost abolished the effect of the light adaptation.

Thus, we conclude that the illumination releases calcium from the organelles. The changes of the cytosolic calcium concentration decides the degree of the light adaptation of the photoreceptors.

Key words　*Limulus polyphemus*, Photoreceptor, Calcium concentration, Calcium chelator, Lightbump